

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学
博 士 后 研 究 工 作 报 告

单细胞电化学研究

胡 仁

工作完成日期 2010 年 11 月

报告提交日期 年 月

厦 门 大 学

2010 年 12 月

单细胞电化学研究

Single Cell Electrochemistry

博 士 后 姓 名： 胡 仁

流动站（一级学科）名称： 生物学

专 业（二级学科）名称： 细胞生物学

研究工作起始时间 2007 年 12 月

研究工作期满时间 2010 年 11 月

厦 门 大 学

2010 年 12 月

厦门大学博硕士论文摘要库

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版,有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅,有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索,有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

电子版在 年解密后适用本授权书。

导师签名: _____ 日期: _____ 年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

内 容 摘 要

采用电化学的方法检测单细胞水平的生命现象（包括氧化应激和胞吐作用等）可为相关疾病的病理研究及诊断治疗等提供重要的理论和实验依据。然而，由于单细胞电化学检测的技术细节繁杂，对操作者技能的要求很高等原因，目前国际上只有少数几个小组（Wightman 小组、Ewing 小组、Amatore 小组等）具有完备的实验系统。本工作的主要内容是搭建适用于单活细胞电化学检测的系统设备，构建细胞模型并在其基础上结合具体的生物学问题进行实验以获得技术应用方面的突破。

在中法国际联合实验室 XiamENS 的工作框架下，我们与 Amatore 教授实验室合作开展了单细胞水平 MG63 成骨肉瘤细胞的氧化应激释放物种的检测工作，并且引入单细胞电化学检测技术，在厦门大学搭建了一套先进的单细胞电化学检测系统。目前我们建立起的单细胞电化学检测系统已成功应用于经典体系（PC-12 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞纳米囊泡神经递质胞吐释放）的检测。在此基础上，通过将 siRNA 技术与单细胞电化学技术联用，我们尝试在单细胞水平上检测 Importin 13 蛋白静默前后 PC-12 细胞胞吐过程的变化，从而探究蛋白在胞吐作用中的功能。初步研究结果显示 Importin 13 蛋白对 PC-12 细胞的胞吐过程有一定的调制作用，具体作用机理有待进一步深入研究。

关键词：单细胞电化学，MG63 成骨肉瘤细胞，氧化应激，胞吐作用，PC-12 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

In the 1990s, the electrochemical technique was developed to monitor the cellular secretions at single living cell level, owing to its advantages of excellent sensibility, high temporal resolution, direct detection, etc. The electrochemical studies on living cell activities, such as oxidative stress and exocytosis provide both theoretical support and experimental inquiries to our understanding of the corresponding diseases and further contribute to their diagnosis and treatments. However, due to the complicated skill details and the highly requirements to the performers, the widely spread of this sophisticated technique is in fact hindered. The aim of this work is to construct a single cell electrochemical detection system and to advance the technique by combining biological techniques targeting directly the problems of biological significance.

Under the framework of the XiamENS lab, we collaborated with Amatore's team in ENS and investigated the reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated by MG63 osteosarcoma cells in response to a mechanical stress. It was shown that, The RONS released by a single MG63 exhibited a high $\text{NO}^\bullet/\text{H}_2\text{O}_2$ ratio, which is perfectly consistent with the malignant bone formation ability of the osteosarcoma cells. Using amperometry, we established for the first time a direct link between osteosarcoma bone cells and their enhanced production rate of NO^\bullet . Afterwards, we introduced the technique to Xiamen University and established a new advanced single cell electrochemical detection set-up. Catecholamine exocytosis from PC-12 cells was developed as a model system. The on-going efforts are made to elucidate the function of the targeted protein in the process of exocytosis, by coupling the electrochemical detection with the siRNA technique.

Keywords: Single cell electrochemistry, MG63 osteosarcoma cells, Oxidative stress, Exocytosis, PC-12 rat pheochromocytoma cells.

厦门大学博硕士论文摘要库

目 次

1. 引言.....	1
1.1. 单细胞电化学检测技术.....	1
1.2. 单细胞氧化应激释放的电化学检测.....	1
1.3. 儿茶酚胺纳米囊泡胞吐释放的电化学检测.....	2
1.4. 本工作的主要内容.....	3
2. 实验.....	3
2.1. 单细胞电化学检测系统.....	3
2.2. 碳纤维微电极的制备.....	6
2.3. 细胞培养.....	7
3. 结果与讨论.....	9
3.1. 单 MG63 成骨肉瘤细胞氧化应激水平的电化学检测.....	9
3.2. PC-12 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞神经递质量子释放的电化学检测...12	12
3.2.1. PC-12 细胞的经典响应信号.....	12
3.2.2. PC-12 细胞响应信号的影响因素.....	15
3.2.3. 电化学/siRNA 技术耦合检测 importin 13 在胞吐过程中的作用.....	16
4. 总结与展望.....	18
参考文献.....	18
致谢.....	21
博士生期间发表的学术论文、专著.....	22
博士后期间发表的学术论文、专著.....	24
个人简历.....	25
联系地址.....	27

厦门大学博硕士论文摘要库

1 引言

细胞间通讯是指多细胞生物中,其组成细胞之间通过高度精确和高效地发送与接收信息,并通过放大引起快速的细胞生理反应,或者引起基因活动,而后发生一系列的细胞生理活动来协调各组织活动,使之成为生命的统一整体对多变的外界环境作出综合反应。细胞间通讯是各组织、器官协同工作的基础。

多细胞个体的细胞间通讯可以看做是以细胞为最小单元组成的复杂网络体系,这与以个人电脑为最小单元的互联网系统类似。当然两者信息传输的载体有本质的差别:互联网是以电磁波等物理信号来进行通讯的,生命体内的信号传导则主要依赖于化学信号。细胞间通讯时,通常是一个细胞(释放细胞)释放特定的生物化学或者化学信号分子,然后被另一个细胞(接收细胞)识别。根据信息传递的目标和范围的不同,这些释放物质或者被释放到生理体液(如流动的血液)中,或者某个严格限定的空间(如突触间隙),或者直接被排放到体外(如外激素)等。一方面这些化学分子具有多样性、特异性,另一方面其释放量通常很少,因此这些细胞释放物的分析检测是研究细胞间通讯功能的一个巨大挑战。

1.1 单细胞电化学检测技术¹⁻²

单细胞电化学检测技术是一种以活细胞为研究对象的电化学检测技术。将与细胞尺寸相当甚至更小的超微电极定位于单细胞细胞膜的附近,从而可以实时、原位地检测细胞在响应刺激时释放的具有电化学活性的物种³。20世纪90年代初,随着膜片钳技术的日臻完善以及超微电极制备技术的发展,Wightman小组率先采用碳纤维电极检测了牛肾上腺嗜铬细胞的胞吐过程,首次实现了儿茶酚胺胞吐释放的直接检测⁴。自此,这一技术开始在细胞释放物研究方面发挥重要作用。目前,单细胞电化学检测技术被成功应用于定量检测单个纳米囊泡神经递质(如多巴胺等)的胞吐释放以及单细胞水平氧化应激产物(NO 、 H_2O_2 、 ONOO^- 、 NO_2^- 等)的生成等。对于这些难以用常规生物原位检测技术(如荧光)捕捉的生物活性小分子,电化学技术则可提供高灵敏度(pA级)、高时间分辨(亚ms级)的原位信息。以下两节分别就单细胞氧化应激物种和儿茶酚胺释放的电化学检测作简要介绍。

1.2 单细胞氧化应激释放的电化学检测

氧化应激是机体活性氧物种与抗氧化系统之间平衡失调引起的一系列适应性的反应。氧化应激被证明与多种人类疾病如动脉硬化、帕金森症、老年痴呆症等相关⁵⁻⁷。细胞的氧化应激是指细胞内活性氧物种与抗氧化系统之间的平衡向前者倾斜,即活性氧物种过度累积的一种现象。近年来的研究表明活性氮物种如一氧化氮也是氧化应激中重要的参与者。一氧化氮可与超氧根离子迅速反应产生 ONOO^- ,该物质被认为是巨噬细胞用来消化内吞物的重要武器。活性氧物种和活性氮物种被统称为活性氧氮物种(RONS)⁸⁻⁹。一些小分子 RONS 通常也是细胞间通讯中重要的信号分子。

RONS 的检测方法主要包括荧光法、化学发光法、电子顺磁共振法、电化学方法等¹⁰⁻¹³。其中电化学检测技术是用于单细胞氧化应激检测最直接高效的方法。该方法通常采用镀有铂黑的碳纤维电极。利用铂黑电极的高电化学活性可以收集单细胞释放的 RONS 物种,主要包括: NO 、 H_2O_2 、 ONOO^- 和 NO_2^- 。通过在四个不同电极电位下收集到不同物种的信号,解析之后可以得到相应物种在单细胞水平的释放量。该方法已经被成功应用于巨噬细胞^{9, 14-15}、成纤维细胞¹⁶⁻²⁰等。

1.3 儿茶酚胺纳米囊泡胞吐释放的电化学检测

胞吐作用是将细胞内的分泌泡或其他某些膜泡中的物质通过细胞质膜运出细胞的过程。它包括组成型胞吐作用和调节型胞吐作用。通过连续的组成型胞吐作用,新合成的囊泡膜的蛋白和脂类不断地供应质膜更新,而囊泡内可溶性蛋白分泌到细胞外形成细胞外基质组分或者作为营养成分扩散到胞外液等。调节型胞吐作用主要发生在特化的细胞,如神经细胞、分泌细胞,这些细胞产生的神经递质或者分泌物等储存在囊泡内,当细胞在受到胞外信号刺激时,囊泡与质膜融合并将内含物信号分子(如神经递质、激素等)释放出去。调节型胞吐作用在细胞间通讯中起着至关重要的作用。如重要的神经类物质儿茶酚胺(包括多巴胺,去甲肾上腺素和肾上腺素等,其主要生理作用是使血管收缩)的受激胞吐作用。儿茶酚胺通常储存在致密核心囊泡(large dense core vesicle, LDCV)之中,尺寸分布在几十到几百个纳米(因细胞而异)。在受激情况下,这些纳米囊泡可以在很短的时间内(通常在毫秒级)释放其内含物。以儿茶酚胺胞吐作用为模型体系对调节型胞吐作用的生物学功能及其机制做深入地研究有利于促进人们对于这一生命活动规律的深入了解。而深入研究胞吐过程则依赖于对纳米囊泡释放过程进

行实时、原位地检测。

用于实时、原位检测纳米囊泡胞吐过程的方法主要有：膜片钳方法²¹⁻²³、电化学安培法²⁴⁻²⁶、膜片钳-安培法²⁷、隐失场显微镜方法（TIRFM，即全内反射荧光显微镜）²⁸⁻²⁹等。膜片钳方法采集的是胞吐过程中由于囊泡膜与质膜发生融合（或其逆过程）引起的膜电容的变化。TIRFM 可观察用荧光标记的囊泡在细胞膜附近的运动以及囊泡在细胞膜上的释放等。安培法则直接采集被释放物种的电信号，可准确得到被释放物的量等信息，结合其高时间分辨率，该技术特别适合于纳米囊泡胞吐作用的动力学研究。

1.4 本工作的主要内容

由于单细胞电化学检测技术的技术细节相对繁杂、对仪器精密度和操作人员的操作水平有较高要求等因素，目前国际上只有少数几个实验室（如美国 Wightman 教授实验室和 Ewing 教授实验室，法国 Amatore 教授实验室）拥有比较完备的系统。我们通过与 Amatore 教授实验室合作，成功引入了单细胞电化学检测技术。本博士后工作的主要内容包括：

（1）负责在厦门大学搭建了一套先进的单细胞电化学检测系统，系统由显微操作（Nikon Ti-U 显微镜、Sutter MP285 R/L 显微操作手、Eppendorf Femtojet 显微注射器及 DT-6050M 防震平台）和微弱电流检测（Axon Axopatch 200B-2、Digidata 1440A 数模转换器）两个部分组成，该系统可实现 pA 级电流的检测，时间分辨达到亚毫秒级别；

（2）首次开展单 MG63 成骨肉瘤细胞氧化应激释放的电化学检测工作，从单细胞水平上探索氧化应激物种在骨平衡中的重要作用；

（3）建立 PC-12 大鼠嗜铬细胞瘤细胞儿茶酚胺的量子释放模型体系，结合 siRNA 技术开展蛋白功能与胞吐作用的关联性研究。

2 实 验

2.1 单细胞电化学检测系统

单细胞的电化学检测技术是在膜片钳技术发展的鼎盛时期出现的,将膜片钳技术中使用的玻璃电极替换成电化学微电极

(通常是碳纤维电极),便可实现单细胞释放物的电化学检测。与膜片钳技术检测细胞膜离子通道电流不同的是,单细胞电化学检测的是被细胞释放到膜外的电化学活性物种,如神经递质、氧化应激物种等。单细胞电化学检测无需进行电极与膜的封接,只需将电极的工作表面与细胞膜接触(或者置于细胞膜的上方),如图 2-1 所示,这一工作模式通常被称作“人工突触”模式。

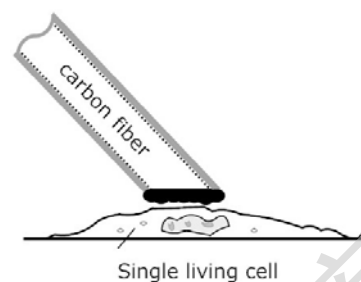


Figure 2-1. Artificial Synapse

突触是神经元之间或者神经元与效应器之间相互接触并借以传递信息的特异性接头,包括化学突触和电突触。其中,化学突触占主导地位。典型的化学突触中,信号分子从突触前膜通过胞吐作用被释放到突触间隙(宽约 20 nm),扩散到突触后膜并与其上的特异性受体结合,产生突触后细胞的局部电位等反应。通过突触的模式,神经网络中的信息得到高速和高效的传导。单细胞电化学检测中,工作电极与被测细胞非常接近或者直接接触,细胞受激后分泌的活性分子扩散到电极表面并在其上产生可被检测的信号(电流或者电位)。通过采用类似突触结构的工作模式,可以实现对单细胞分泌物的实时和高效的信号采集。

单细胞电化学检测技术的实施可借助膜片钳技术的设备,包括显微操作和微弱信号检测两个部分。显微操作部分包括显微镜、显微操作器、显微注射器和防震平台,用于对细胞、电极及玻璃微管的观察、定位和实施刺激;微弱信号检测部分则采用膜片钳放大器,辅以法拉第屏蔽箱以抵抗电磁干扰。

我们搭建的系统如图 2-2 所示,整套设备放置于一个 80cm×150cm 的不锈钢桌面上。不锈钢金属板具有一定的弹性,容易引入机械振动,因而在桌面先放置一块大理石板,然后在上面搭建单细胞电化学检测系统。在左侧,显微镜主体被放置于防震平台之上,法拉第屏蔽箱之中。显微镜的控制部分和其它仪器主体,包括显微镜光源开关、荧光激发光源、显微操作器的控制器、显微注射器主体以及膜片钳放大器主体,均集中放置于平台的右侧。将膜片钳放大器的虚地以及显微镜主体通过导线与法拉第屏蔽箱相连,可使系统噪音达到最小。系统采用

的各个仪器部件的相关参数列于表 2-1。



Figure 2-2. Single cell electrochemistry setup

Table 2-1. Instrumental parameters for the single cell electrochemistry setup

序号	名称/型号	主要参数	备注
1	倒置显微镜 /Nikon Ti-U	a) 具有明视场、相差和霍夫曼观察方法； 配有数字图像采集 CCD，荧光等观察 功能。 b) 观察端口： 4 个分光端口。	
2	显微操作器 /Sutter MP-285/LR	a) 行程：移动最大距离：25.4mm b) 低分辨率： $\leq 0.2\mu\text{m}/\text{步}$ ；高分辨率： $\geq 0.04\mu\text{m}/\text{步}$	

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库